



UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI - UNIVATES
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPEX
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AMBIENTAIS
SUSTENTÁVEIS - PPGSAS

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A EFLUENTES DE CURTUME NA FERTILIDADE DE
CAMUNDONGOS**

Evandro da Silva Barros

Lajeado, julho de 2019

Evandro da Silva Barros

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A EFLUENTES DE CURTUME NA FERTILIDADE DE CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Ambientais Sustentáveis, da Universidade do Vale do Taquari - Univates, como parte da exigência para a obtenção do grau de mestre em Sistemas Ambientais Sustentáveis.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho

Co-orientadora: Profa. Dra. Simone Stülp

Lajeado, julho de 2019

Evandro da Silva Barros

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A EFLUENTES DE CURTUME NA FERTILIDADE DE CAMUNDONGOS

A banca examinadora abaixo aprova a dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Ambientais Sustentáveis, da Universidade do Vale do Taquari – Univates, como parte da exigência para obtenção do grau de Mestre em Sistemas Ambientais Sustentáveis:

Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho
Universidade do Vale do Taquari – Univates

Prof. Dra. Simone Stülp
Universidade do Vale do Taquari – Univates

Prof. Dr. Guilherme Liberato da Silva
Universidade do Vale do Taquari – Univates

Prof. Dra. Camille Eichelberger Granada
Universidade do Vale do Taquari – Univates

Prof. Dr. Gunther Gehlen
Universidade Feevale

Lajeado, 30 de julho de 2019

A Deus, primeiramente, por ter renovado
as minhas forças a cada dia. À minha
família, pelo incentivo e por acreditar em
mim.

AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus que tem derramado bênçãos sem medidas sobre minha vida e da minha famílias, colocando pessoas mais que especiais na longa jornada da vida.

À minha família e amigos, por todo apoio e compreensão que demonstraram durante essa caminhada.

Ao meu orientador, professor Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho, pela paciência e os valiosos conselhos, alguém que passei a admirar também como pessoa. Exemplo de pai.

À minha coorientadora, professora Dra. Simone Stülp, pelo apoio e importante contribuição na conclusão desta dissertação.

Igualmente agradeço à Bárbara Schmitt, Ana Flávia Tischer da Silva, Ana Paula Binato Souza, Ana Micaela Camini e Manoela Pasini, colegas que trabalharam incansavelmente durante os experimentos.

Agradeço também aos professores do PPGSAS pelo conhecimento e experiências transmitidos durante curso, essenciais para o meu desenvolvimento profissional e acadêmico.

Agradecimento ao Curtume por nos receber e disponibilizar seu espaço e tempo para que fosse possível a realização dessa pesquisa.

À UNIVATES por oportunizar o conhecimento de um mundo de coisas novas e de toda estrutura à disposição para o desenvolvimento profissional e acadêmico de qualidade.

RESUMO

Os efluentes provenientes das indústrias de curtume possuem elevada carga poluidora, geralmente contendo substâncias capazes de provocar alterações significativas na dinâmica das populações de pequenos mamíferos, bem como alterações drásticas na saúde de seres humanos que possam ter contato com esse tipo de resíduo. Apesar da restrita legislação, é frequente o descarte de efluentes com padrões inadequados em corpos d'água. Recentemente foi demonstrado que o contato com efluentes de curtume em concentração maior que 5% causa degeneração testicular em ratos. Estes dados são um importante indicativo da toxicidade reprodutiva deste contaminante, contudo é importante definir se concentrações ainda menores, e mais próximas da realidade ambiental causam o mesmo efeito. Assim, esta dissertação teve objetivo de avaliar os efeitos toxicológicos no sistema reprodutivo de camundongos machos expostos de forma crônica (30 dias) a esse tipo de efluente. Para isso, foram utilizados 40 (quarenta) camundongos Balb/c distribuídos em 04 (quatro) grupos experimentais conforme o grau de contaminação da água de beber, a saber: 0% (controle), 0,1%, 0,5% e 5%. A exposição às diferentes concentrações do efluente ocorreu durante 30 (trinta) dias. Após este período, os machos foram pareados com fêmeas para avaliação de parâmetros de fertilidade. Em seguida, foram eutanasiados para avaliações morfológicas, celulares e moleculares nos tecidos reprodutivos. Para tanto, foram avaliados parâmetros de qualidade seminal. Em relação aos parâmetros físico-químicos avaliados no efluente, ficaram evidentes as altas concentrações de cromo total, disruptor endócrino com potencial de provocar danos à saúde. Os dados obtidos demonstram que os machos expostos a 0,5% e 5% do efluente tiveram alterações morfológicas nos espermetazóides, apresentando principalmente defeitos de cabeça. Os machos do grupo 5% tiveram aumento expressivo na massa corpórea. As fêmeas pareadas com os machos dos respectivos grupos apresentaram redução significativa no peso da placenta. Dessa forma, essa pesquisa demonstra que mesmo em baixas concentrações a exposição a efluentes de curtume pode causar efeitos negativos no sistema reprodutivo de camundongos machos. Isso permite compreender o quanto esse tipo de efluente pode impactar negativamente uma população inteira de mamíferos que dependa de corpos d'água contaminados.

Palavras-chave: Efluentes de curtume. Camundongos. Desregulação endócrina.

ABSTRACT

Effluents from tanneries have a high polluting load, usually containing substances capable of causing significant changes in the dynamics of small mammal populations, as well as drastic changes in the health of humans that may have contact with this type of waste. Despite restrict legislation, discharges of inadequate standards into water bodies are often discarded. It has recently been shown that contact with tannery effluents in a concentration greater than 5% causes testicular degeneration in rats. These data are an important indicator of the reproductive toxicity of this contaminant, however it is important to define whether even lower concentrations closer to environmental reality have the same effect. Thus, this dissertation aimed to evaluate the toxicological effects on the reproductive system of male mice chronic (30 days) exposed to this type of effluent. For this, 40 (fourteen) Balb / c mice were distributed in 04 (four) experimental groups according to the degree of drinking water contamination, namely: 0% (control), 0.1%, 0.5% and 5% Exposure to different effluent concentrations occurred for 30 (thirty) days. After this period, males were paired with females to evaluate fertility parameters. They were then euthanized for morphological, cellular and molecular evaluations in reproductive tissues. For this, seminal quality parameters were evaluated. Regarding the physicochemical parameters evaluated in the effluent, it was evident the high concentrations of total chromium, endocrine disruptor with potential to cause health damage. The data show that males exposed to 0.5% and 5% of the effluent had morphological changes in spermatozoids, presenting mainly head defects. Males in the 5% group had a significant increase in body mass. Females paired with males of the respective groups showed significant reduction in placental weight. Thus, this research demonstrates that even at low concentrations exposure to tannery effluents can have negative effects on the reproductive system of male mice. This allows us to understand how much this type of effluent can negatively impact an entire mammalian population that depends on contaminated bodies of water.

Keywords: Tannery effluents. Mice. Endocrine disruption.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Países de destinos e estados de origem do couro.....	13
Figura 2 – Desenho Experimental da Pesquisa	22
Figura 3 – (A) Evolução do peso corporal dos machos durante as semanas do experimento; (B) Consumo médio diário de água.....	25
Figura 4 – (A) Peso relativo dos testículos após dissecação ao final dos 30 dias de exposição ao EC; (B) Peso relativo do epidídimo	26
Figura 5 - (A) Número de fetos das fêmeas acasaladas com os machos dos diferentes grupos e eutanasiadas 18 dias depois; (B) Número.	27
Figura 6 - (A) Motilidade espermática total de camundongos dos diferentes grupos; (B) Motilidade espermática total de camundongos.	28
Figura 7 - (A) Morfologia espermática normal dos diferentes grupos de camundongos expostos ao EC; (B) Camundongos que o indicam diferenças significativas.	29
Figura 8 - (A) Espermatozóide com cabeça amorfa; (B) Espermatozóide com cabeça em formato de gancho de botão e em formato de alfinete.	29
Figura 9 - (A) Peso da placenta de fêmeas de camundongos pareadas com machos expostos ou não ao EC; (B) Peso dos	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exportações Brasileiras de Couros e Peles	13
Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do efluente	15
Tabela 3 – Resultados da análise físico química realizada	24

LISTA DE SIGLAS

CeMBE	Centro de Modelos Biológicos e Experimentais
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cr(III)	Cromo trivalente
Cr(VI)	Cromo hexavalente
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DDT	Dietildifeniltricloroetano
DE	Desreguladores Endócrinos
DES	Dietilestilbestrol
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EC	Efluente de Curtume
FOB	Free On Board
GC	Grupo Controle
G01	Grupo de animais exposto a 0,1% de efluente
G05	Grupo de animais exposto a 0,5% de efluente
G5	Grupo de animais exposto a 5% de efluente
IC	Carbono Inorgânico
PCD	Policlorado de Bifenila
TOC	Carbono Orgânico Total
VMP	Valor Máximo Permitido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.4 Objetivos	10
1.4.1 Objetivo Geral	10
1.4.2 Objetivos Específicos	10
1.5 Justificativa	10
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	11
2.1 A Indústria do Couro	11
2.2 Impactos Ambientais de Curtumes	14
2.3 Medidas de Controle e Tratamento de Efluentes	16
2.4 Desreguladores Endócrinos	17
2.4 Espermatogênese.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Análise do Efluente de Curtume.....	20
3.2 Animais e Grupos Experimentais	21
3.3 Desenho Experimental	21
3.4 Avaliação da Biomassa Corpórea.....	22
3.5 Avaliação do Efeito do Dominante Letal.....	22
3.6 Avaliação da Qualidade Seminal	23
3.8 Aspectos Éticos	23
3.9 Análise dos dados.....	23
4 RESULTADOS	24
4.1 Análise do Efluente	24
4.1 Biomassa Corpórea.....	24
4.2 Avaliação do Efeito do Dominante Letal	27
4.3 Avaliação da Qualidade Seminal	27
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	36

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A EFLUENTES DE CURTUME NA FERTILIDADE DE CAMUNDONGOS

1 INTRODUÇÃO

Os impactos provocados, no meio ambiente e na saúde dos seres vivos, por contaminantes presentes em efluentes industriais podem ser catastróficos. Se tornou uma realidade a necessidade das indústrias observarem a racionalização de recursos ambientais, além de se adequarem aos padrões da legislação, exigências de clientes e fornecedores, principalmente após o surgimento do tema desenvolvimento sustentável, no qual as empresas se viram pressionadas a adotar uma prática de responsabilidade socioambiental (ALVES e BARBOSA, 2013).

Nos efluentes industriais estão presentes os mais diversos tipos de compostos químicos, dentre estes, podem existir compostos recalcitrantes e refratários, que podem atingir concentrações superiores às doses letais em alguns seres vivos, devido ao potencial de bioacumulação, que pode resultar em efeitos mutagênicos e cancerígenos em seres humanos (ALMEIDA et al., 2004).

A indústria curtumeira, apesar da importante contribuição econômica, gera continuamente diversos impactos ambientais, seja por poluição atmosférica, como também a geração de grandes quantidades de resíduos sólidos e efluentes líquidos altamente contaminados por produtos químicos essenciais ao curtimento das peles (ARCHETI, 2001; GODECKE et al., 2012).

O Cr(III) é o exemplo de um composto químico presente em efluentes de curtume. Caso seja descartado em locais inadequados, juntamente com a influência de fatores externos, como calor, umidade, pH, pode ocorrer a oxidação do Cr(III) em Cr(VI) (cromo hexavalente). Na sua forma hexavalente, o cromo possui extrema facilidade de penetração por via cutânea, é altamente persistente no ambiente e pode se bioacumular devido à dificuldade de sua excreção, além de ser extremamente nocivo devido sua característica mutagênica, carcinogênica e da sua capacidade de desregular funções endócrinas nos organismos (GARCIA, 2015; LIMA et al., 2017).

Os desreguladores endócrinos (DE) são todas as substâncias capazes de mimetizar a função de um hormônio natural do corpo e podem estar presentes em efluentes da indústria do couro (MOYSÉS et al., 2017). Há evidências de que os DE

afetam de forma negativa a vida das pessoas, sendo a obesidade um desses problemas (PONTELLI; NUNES; OLIVEIRA, 2016). Isso ocorre devido à característica que alguns DE possuem de imitar efeitos de hormônios naturais fazendo com que seus receptores específicos sejam acionados, enquanto outros podem se unir aos receptores e bloqueiam a ação dos hormônios naturais no organismo (GUIMARÃES e ASMUS, 2010).

Sendo assim, esta pesquisa observou quais os efeitos no sistema reprodutivo de camundongos machos *balb/cJ* expostos a baixas concentrações de efluentes de curtume (EC). Pressupõe-se que o contato dos animais com a água de beber contaminada com EC pode causar alterações que comprometem, principalmente, a morfologia dos espermatozoides, provocando efeitos mais intensos no longo prazo.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos toxicológicos no sistema reprodutivo de camundongos machos expostos a efluentes da indústria de curtume.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a composição físico-química de amostra de efluente de curtume;
- Avaliar em camundongos machos os efeitos da exposição por 30 dias ao EC, com foco nos órgãos reprodutivos e produção de espermatozoides.
- Verificar os efeitos da exposição de camundongos machos ao EC no desenvolvimento fetal da prole.

1.5 Justificativa

A indústria do couro é uma das mais que mais causam impactos em corpos de água doce. Dependendo das condições e reações que podem ocorrer, o efluente resultante dessa atividade pode conter quantidade significativa de Cr(VI), que é altamente nocivo por ser mutagênico e carcinogênico (GARCIA, 2015). Ademais, esse efluente também contém certas quantidades de ftalatos, um tipo de disruptor endócrino, que pode causar danos à saúde de animais e seres humanos, principalmente em seu sistema reprodutivo (MOYSES, F. et al, 2017).

Recentemente, pesquisa envolvendo camundongos Swiss expostos ao efluente bruto coletado no pátio de uma indústria curtumeira e àquele diluído em água a 5% demonstraram mudanças comportamentais, alterações histológicas nos testículos, desorganização de células germinativas nos túbulos seminíferos, bem como processo inflamatório nos espaços intertubulares, associado ao aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias (IFN-gamma e CCL2) nos testículos (GUIMARÃES, 2018).

Além disso, foi observado o aumento de anormalidades espermáticas e redução do total de espermatozoides produzidos, que em conjunto com as alterações relatadas anteriormente, pode ter sido responsável pela baixa performance reprodutiva dos animais expostos ao poluente (avaliada a partir do teste do dominante letal). Estes dados evidenciam a importância do conhecimento do real impacto ambiental do descarte de efluentes de curtume. Contudo, a concentração de 5% pode não ser próxima à concentração encontrada no ambiente após a sua liberação em corpos d'água. Assim, faz-se necessário verificar se o efluente apresenta os mesmos impactos em concentrações mais reduzidas como em 0,1% e 0,5%.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A Indústria do Couro

O couro é um material presente em praticamente todas as atividades econômicas e tem a pele animal como sua matéria-prima, que por sua vez é composta por diversos tipos de colágeno e outras substâncias, como graxas, queratinas, dentre outras (MANCOPES, F; GUTTERES, M., 2009).

A indústria do couro depende diretamente de outras atividades econômicas, como a bovinocultura de corte e os frigoríficos, que são os principais fornecedores da matéria-prima: o couro. Por sua vez, esse produto final é destinado às empresas de calçado, vestuário, móveis, artefatos e etc... movimentando, assim, o mercado coureiro (AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2011). Cerca de 55% do couro produzido nos curtumes é destinado à indústria calçadista, seguida pela indústria de estofamento para móveis (15%), a automotiva (10%) e a de vestuário (10%) (BAIN & COMPANY, 2014).

Uma das especificidades dessa indústria é a natureza heterogênea de seu produto, tendo em vista que os frigoríficos e curtumes podem oferecer o couro em

diferentes estágios, atendendo os variados tipos de curtume, como destaca Santos et al, 2002:

- Curtume *Wet Blue* – realiza o primeiro processamento do couro, logo após o abate. Recebe as peles salgadas, faz remoção de pelos, óleos e graxas e ocorre o primeiro banho de cromo, ficando o couro com aspecto azulado e molhado.
- Curtume Integrado – realiza todo o processamento dos pelos, desde o couro cru até o couro acabado.
- Curtume de Semi-Acabado – realiza o processamento do couro *wet blue*, após o processo de secagem, e o transforma em couro *crust* (semi-acabado).
- Curtume de Acabamento – Utiliza já o couro *crust* para processamento e transformação em couro acabado, que possui características mais específicas de acordo com as exigências do cliente e maior valor agregado.

Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores de couro no mundo, possuindo 310 plantas curtidoras, 2.800 indústrias de componentes para o couro e calçados e 120 fábricas de máquinas e equipamentos, gerando cerca de 42.100 empregos diretos. O estado do Rio Grande do Sul e São Paulo são os maiores exportadores de couro do país, sendo China, Estados Unidos e Itália os principais destinos do couro produzido no Brasil (CENTRO DAS INDÚSTRIAS DE CURTUMES DO BRASIL, 2019).

Figura 1 – Países de destinos e estados de origem do couro

Fonte: CENTRO DAS INDÚSTRIAS DE CURTUME DO BRASIL, 2019

O valor arrecadado nas exportações tem caído nos últimos anos. O ano de 2018 encerrou com U\$1,443 bilhão, 24% menor que em 2017 e 181,7 milhões de metros quadrados de pele, 10,2% abaixo que em 2017 (CENTRO DAS INDÚSTRIAS DE CURTUMES DO BRASIL, 2019).

Essa redução, além da crise econômica, pode também estar atrelada às inúmeras tentativas de substituição do couro por outros materiais, principalmente de origem sintética, como o material de plástico injetado cada vez mais comum na indústria de calçados (AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2011).

Tabela 1 – Exportações Brasileiras de Couros e Peles

Mês	Valor FOB (US\$)			Área (m2)		
	2018	2017	2016	2018	2017	2016
Jan	132.850.230	150.594.334	152.457.585	15.639.191	14.722.853	15.373.904
Fev	144.041.578	161.129.539	196.164.787	16.743.477	16.873.366	18.864.153
Mar	147.515.091	192.569.385	185.618.998	16.782.906	20.216.317	17.249.649
Abr	136.997.973	161.555.800	175.733.311	16.935.718	16.246.553	16.000.691
Mai	101.387.577	189.315.724	174.671.885	12.060.974	23.543.748	17.259.084
Jun	134.092.549	148.251.832	160.948.772	17.040.148	15.371.874	15.244.264
Jul	77.720.643	148.621.433	159.222.540	9.932.086	14.941.320	14.864.646
Ago	115.907.135	168.323.058	178.477.077	14.602.510	17.618.510	18.260.955

Set	112.334.309	144.028.851	150.781.276	15.567.199	16.067.573	14.961.275
Out	120.776.754	149.290.587	161.870.007	15.996.995	16.695.816	14.287.484
Nov	113.450.203	132.740.099	155.721.176	16.111.486	13.813.058	13.994.408
Dez	105.893.140	153.081.851	180.738.566	14.245.187	16.183.081	17.555.248
Tota	1.442.967.18	1.899.502.49	2.032.405.98	181.657.87	202.294.06	193.915.76
I	2	3	0	7	9	1

Fonte: MDIC/SECEX – Elaborado pelo CICB

* Metragem com Flor e Raspa

2.2 Impactos Ambientais de Curtumes

É nítido que o setor do couro é um grande fator positivo na economia brasileira, no entanto a indústria coureira tem sido vista com preocupação, devido a grande quantidade de água utilizada e de efluentes/resíduos gerados durante a fase de beneficiamento do couro bovino (SILVA, et al., 2015).

As indústrias do segmento coureiro têm um elevado potencial poluidor no universo das atividades econômicas industriais. Por utilizar grandes quantidades de água, principalmente nos procedimentos operacionais para banhos de tratamento e lavagem de peles e couros, consequentemente essas indústrias geram grandes volumes de efluentes, sendo que se gasta, em média, 30.000 litros de água para produção de 250 kg de couro curtido (PASCOAL et al., 2007).

No estudo de identificação dos custos ambientais em um curtume na cidade de Tapera, RS, um dos grandes problemas ambientais dessa atividade é a alta demanda de água que acaba resultando em quantidades elevadas de efluentes e também o processo de curtimento, o qual utiliza grande quantidade de cromo que, apesar do tratamento primário e secundário, não é totalmente eliminado, sendo consequentemente descartado no meio ambiente (PIENIZ, 2001).

Elevadas quantidades de resíduos sólidos também são resultantes nas diferentes etapas de processamento do couro. Grande parte dos resíduos é constituída por cal e sais de sulfeto que não foram absorvidos pela pele animal, além da elevação da demanda química de oxigênio e demanda bioquímica de oxigênio (DQO e DBO) influenciada pela retirada de pelos, carnes, peles e tecido adiposo durante o processamento do couro (GODECKE; RODRIGUES E NAIME, 2012).

Os efluentes gerados em curtumes são muito complexos devido à grande variedade de agentes químicos utilizados no processamento das peles (MOYSÉS et al., 2017). Os produtos químicos são essenciais e utilizados em praticamente todas

as fases de processamento das peles, como taninos orgânicos, engraxantes, corantes, juntamente com colágeno e cromo não são totalmente absorvidos no processo e grande parte, cerca de 85%, é perdida e descartada das mais variadas formas nos fluxos dos efluentes residuais (FERRARI, 2015; GUTTERRES, 2003).

Os lodos provenientes de ETE's (Estações de Tratamento de Esgoto) em curtume, quando não recolhidos adequadamente e encaminhado para tratamento, podem conter teores elevados de cromo (III). Esse tipo de contaminante quando descartado de forma inadequada no ambiente, pode oxidar para cromo(VI) em determinadas condições e provocar impactos ambientais significativos, contaminando o solo, águas superficiais e subterrâneas (GARCIA, 2015).

O cromo na indústria de curtume é frequentemente utilizado no processo de transformação das peles em couro. Normalmente, águas superficiais têm baixas concentrações de cromo, mas caso exista curtume nas proximidades desses cursos d'água, pode haver uma alteração nos níveis desse metal por conta do despejo de efluentes que, mesmo após o tratamento, pode conter essa substância acima dos padrões exigidos pela legislação (CARDOSO, 2018).

O principal impacto ambiental de curtumes, advém da geração de efluentes líquidos, no entanto, além dessa carga poluidora, caso alguns procedimentos operacionais não sejam executados, os curtumes podem ter problemas de odor devido à formação de gás sulfídrico, o que pode causar incômodo na população adjacente ao empreendimento (DIAS, CARLONI e MELO JÚNIOR, 2014).

A tabela 2 apresenta a composição físico-química de um efluente de curtume localizado no Rio Grande do Sul após passar por um sistema de tratamento convencional (físico-químico e biológico).

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do efluente de curtume após tratamento

Parâmetros	Água de alimentação	Efluente
DQO (mgO ₂ /L)	8	320
DBO (mgO ₂ /L)	6	240
pH	7,8	7
Sólidos totais (mg/L)	142	10.469
Nitrogênio total (mg/L)	3,3	180

Nitrogênio amoniacal (mg/L)	5,4	90
Cloretos (mg/L)	10,4	3650
Fósforo (mg/L)	0,04	0,9
Cromo total (mg/L)	0,01	0,3
Cálcio total (mg/L)	9,8	218
Magnésio total (mg/L)	5,4	198
Sódio total (mg/L)	8,7	2.800

Fonte: MOYSÉS et al., (2017).

Além disso, o arsênio inorgânico (As) é um metal pesado do grupo 15 (5A) da classificação periódica, sendo considerado um dos principais poluentes de corpos d'água e pode estar presente em baixas concentrações em efluentes da indústria do couro e sua intoxicação pode causar efeitos crônicos ou agudos (CARVALHO, 2009). O arsênio pode estar presentes em variadas formas e sua solubilidade em água é um fator que facilita sua absorção em poucas horas no trato gastrointestinal, tanto em humanos como animais de experimentação (DESCHAMPS E MATSCHULLAT, 2007).

2.3 Medidas de Controle e Tratamento de Efluentes

Durante toda sua vida útil, os curtumes, além de seus produtos (couro), geram também grande quantidade de materiais que necessitam de atenção específica e um bom gerenciamento com o objetivo de garantir o aproveitamento desses subprodutos e/ou descarte final de forma adequada, que atenda à legislação, minimizando os riscos de ocorrência de impactos ambientais (FERRARI, 2015).

As áreas do setor industrial do couro mais carentes de estudos são as referentes à redução da carga poluidora presente no efluente e o tratamento desses efluentes com o mínimo possível de geração de lodo (SAUER, 2006). Como volume total de efluentes é função da quantidade de água utilizada no processo, quanto menos reusos e reciclos de efluentes são praticados, mais água terá de ser captada e, conseqüentemente, mais efluentes serão gerados no processo (FERRARI, 2015).

A fase de ribeira (etapa inicial que envolve desde o pré-remolho até a lavagem após a descalcinação e purga ou até o píquel, realizado antes do curtimento em si), é onde se gera a maior quantidade de efluentes e com elevada carga orgânica

proveniente de gorduras, graxas e sangue (BASSO, 2010).

Os principais resíduos sólidos gerados no processo de fabricação do couro são: aparas caleadas e não caleadas, carnaça, material curtido e lodos dos sistemas de tratamento dos efluentes líquidos, resultantes das diversas fases de processamento de peles e tratamento de efluentes (DIAS, CARLONI e MELO JÚNIOR, 2014).

Algumas formas de disposição final de resíduos sólidos para minimizar os impactos provocados pelos curtumes são a disposição em aterros controlados, a incineração, a solidificação (biorremediação e fitorremediação), a reciclagem e a descromagem (GARCIA, 2015).

Os aterros controlados não são considerados como uma alternativa eficaz de disposição final de resíduos sólidos, principalmente de resíduos não-inertes (cromo). Este tipo de aterro não possui infraestrutura necessária para esse tipo de resíduo, tendo em vista que suas propriedades toxicológica podem se acumular e, por conseguinte, comprometer a área de localização do aterro (SISINNO, 2003).

A incineração dos resíduos é um dos processos mais clássicos, no entanto ainda é muito caro e de utilidade duvidosa, tendo em vista que as reações químicas que ocorrem durante o processo podem transformar os compostos primários em outros ainda mais poluentes, como dioxinas e furanos (FREIRE, et al., 2000).

O uso de Orto-Ftalato de Sódio no tratamento de efluentes de curtumes contendo cromo, mostrou-se bastante eficiente, com uma redução de 59,26% deste componente químico no resíduo (LACERDA, 2010). No entanto, o autor informa que é necessário realizar mais testes e em maior escala, tendo em vista que seu trabalho foi aplicado em apenas 01 (um curtume) no município de Juazeiro-BA.

2.4 Desreguladores Endócrinos

Existe um grupo de substâncias químicas comum no cotidiano que podem interferir nas funções endócrinas de animais e seres humanos, que são os desreguladores endócrinos, afetando a saúde, o crescimento e a reprodução dos seres vivos (BILA e DEZOTTI, 2007). Os autores informam ainda que essas substâncias podem ser sintéticas (alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, policlorados de bifenilas (PCD), bisfenol A, substâncias farmacêuticas, dentre outras) e naturais (estrogênios naturais e fitoestrogênios).

Vários são os termos utilizados para se referir a esses compostos químicos,

como: “agentes hormonalmente ativos”, que é utilizado devido os compostos tomarem a ação de hormônios por mimetismo; também “interferentes endócrinos” ou “desreguladores endócrinos” que se referem a essas substâncias, pois alteram o funcionamento natural do sistema endócrino humano e animal (AQUINO; BRANDT e CHERNICHARO, 2013).

O início das suspeitas dos efeitos dos desreguladores endócrinos ocorreu entre as décadas de 40 e 70, com o surgimento de câncer no sistema reprodutivo de filhas de mulheres que usaram DES (dietilestilbestrol) durante a gravidez. Ainda segundo os autores, foram detectadas anomalias no sistema reprodutivo de jacarés em um lago na Flórida, em consequência da contaminação com DDT (dietildifeniltricloroetano) (BILA e DEZOTTI, 2007). Também por influência dos DDT, em 1957, estudos realizados pelo Departamento de Pesca do Canadá constataram que a grande maioria dos peixes na área norte da ilha de Vancouver acusaram sintomas de cegueira (CARSON, 1962).

Existem evidências em zonas de descarga de águas residuárias dos efeitos de desreguladores endócrinos em peixes e moluscos, sendo observada a presença de níveis elevados de vitelogenina (indicador de bioacumulação estrogênica) e *imposex*, que é considerado um indutor de polihemafroditismo, no qual as fêmeas apresentam órgãos de reprodução masculinos (DUARTE, 2008). Ademais, foi observado que substâncias estrogênicas presentes em pílulas anticoncepcionais depositadas em estações de tratamento de esgoto no Reino Unido ocasionaram a feminilização de peixes machos, como a truta (PURDOM et al., 1994).

Dentre os componentes orgânicos presentes no efluente de curtume estão os ftalatos, que atuam como interferentes endócrinos no organismo dos seres vivos, principalmente no sistema reprodutor masculino (MOYSÉS et al., 2015; LOUREIRO, 2002). Além disso, o arsênio (As) também é considerado um agente de ativação hormonal que pode estar presente em efluentes de curtume e o cromo (VI) têm a capacidade de se bioacumular nos organismos, causando diferentes patologias, sobretudo aquelas que afetam o sistema reprodutor masculino (CARVALHO, 2009; VALE et al., 2011).

A exposição a efluente de curtume por camundongos induz a significativas mudanças comportamentais, alterações histológicas nos testículos, desorganização de células germinativas nos túbulos seminíferos e processos inflamatórios nos espaços intertubulares e que essas alterações ocorreram provavelmente devido ao

aumento da proliferação de células de Leydig associado ao aumento proporcional de células de Sertoli (GUIMARÃES, 2018).

A consequência destes efeitos pode causar um desequilíbrio na dinâmica das populações desses mamíferos em zonas próximas a despejo de efluentes de curtume. Os autores observaram estes efeitos com a exposição diária de 1% de efluente de curtume a 5%. Como os efluentes podem se apresentar mais diluídos em cursos d'água, é importante a verificação de seus efeitos na fisiologia reprodutiva animal após a ingestão crônica de concentrações menores. Tais dados poderão trazer uma melhor compreensão dos reais impactos do despejo de efluente de curtume no meio ambiente.

2.4 Espermatogênese

A espermatogênese é a produção, nutrição e armazenamento temporário de espermatozóides e envolve todo o sistema reprodutor masculino. O sistema é constituído por testículos, epidídimos, ductos deferentes, ductos ejaculadores, uretra, glândulas acessórias, glândulas seminais, glândulas bulbouretrais de Cowper, próstata e pênis (KIERSENBAUM, 2008).

O testículo é um órgão de forma arredondada, dividido em dois compartimentos: tubular (túbulos seminíferos), formado por células germinativas misturadas a uma população de células de Sertoli, que ficam no epitélio seminífero e o intertubular, onde estão localizadas as células de Leydig (produtoras de andrógenos), vasos sanguíneos, nervos, e outros tipos de células (PIRES, 2009; OLIVEIRA, 2014).

As células de Sertoli são extremamente importantes no processo de espermatogênese, é o tipo celular com maior presença nos túbulos seminíferos até a puberdade, quando se tornam estáveis (RUSSEL et al., 1990). Dentre outras funções importantes, a ligação com as células germinativas permite que as células de Sertoli forneçam nutrientes e fatores biológicos essenciais para o seu desenvolvimento, promovendo eficiência no processo de espermatogênese (CHENG E MRUK, 2002). Já as células de Leydig são as responsáveis pela produção de andrógenos, em especial a testosterona, a partir de colesterol (BARDIN, 1996). A produção da testosterona é regulada pelo hormônio luteinizante (LH), produzido na hipófise.

O perfeito equilíbrio na comunicação hormonal entre glândulas endócrinas e as células que participam direta ou indiretamente da espermatogênese é fundamental

para a fertilidade do macho. Qualquer desregulação seja na produção de hormônios ou na expressão de receptores hormonais pode acarretar na perda da qualidade celular do espermatozoide.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise do Efluente de Curtume

O efluente de curtume utilizado nesta pesquisa foi obtido da fase de curtimento da pele bovina (bruto), fornecido por indústria de curtume localizada no Estado do Rio Grande do Sul, município de Lajeado em Janeiro de 2019. A identificação do curtume é mantida em sigilo por questões éticas. A caracterização físico-química e química do efluente bruto de curtume foi realizada pelos laboratórios da TECNOVATES e UNIANALISES. Os parâmetros analisados foram: turbidez, cor, condutividade, pH, Na, K, Ca, Carbono Orgânico Total (TOC) e Carbono Inorgânico (IC).

Para análise de turbidez, foi coletado 100 mL do efluente, que foi acondicionado em Becker de vidro para posterior medição. Para realizar a medição foi utilizado equipamento Turbidímetro Digimed DM TU, o qual é constituído por uma fonte de iluminação, cubeta de amostra e fotodetector.

Para coloração, foram coletados 10 mL de efluente, acondicionado em recipiente de vidro, para posterior medição. Para realizar a medição foi utilizado o colorímetro, modelo DM-50 da Digimed. Já no caso dos parâmetros de sódio, potássio e cálcio, foram coletados 10 mL de efluente, acondicionado em recipiente de vidro, para posterior medição. Para realizar a medição das concentrações foi utilizado o Fotômetro Digimed DM62.

Em relação à condutividade elétrica determinada para o efluente, foi coletado 10 mL de amostras para leitura no equipamento. O equipamento utilizado para esta análise foi o condutivímetro Módulo de Condutividade Metrohm. Já para as análises o carbono orgânico total e carbono inorgânico, foi utilizado o equipamento (TOC Analyzer) da marca Shimadzu®, modelo TOC-VCSH® para as análises das alíquotas de efluente. O TOC funciona através de uma combustão seguida de detecção por infravermelho não dispersivo. O gás de arraste é o oxigênio de alta pureza; a temperatura de combustão da alíquota é de 680°C; trabalha na faixa de 4 ppb a 25000 ppm e os resultados são registrados em mg.L⁻¹ de carbono orgânico,

carbono inorgânico e carbono total. O coeficiente de variação do equipamento nas análises é de até 2,0%. O equipamento permite análises de amostras sólidas ou líquidas. A medição do cromo total foi realizada pelo Laboratório Unianálises e a metodologia utilizada foi a Espectrometria de Emissão Óptica (ICP-OES).

3.2 Animais e Grupos Experimentais

Neste estudo foram utilizados 40 camundongos (20 machos e 20 fêmeas) Balb/c (nulíparos) com 32 dias de vida, obtidos do CEMBE da PUC de Porto Alegre, e mantidos no Laboratório de Habilidades II da Univates durante o experimento. Todos os animais foram mantidos em estantes ventiladas (ALESCO) com controle de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo (com ciclo claro/escuro de 12/12 h) e umidade ($58 \pm 3\%$) controlada. Os camundongos foram agrupados em caixas de polipropileno (nas dimensões 45,4 cm x 30,1 cm x 16,7 cm), com tampas gradeadas de arame galvanizado com tratamento antioxidante. A água e a ração foram oferecidas *ad libitum* durante todo o período experimental. Antes do experimento, os animais foram contrabalanceados a partir da covariável biomassa, de modo que a média da massa corpórea inicial dos camundongos foi estatisticamente igual entre os animais ($P < 0.05$). Os seguintes grupos experimentais foram formados com 5 animais por grupo:

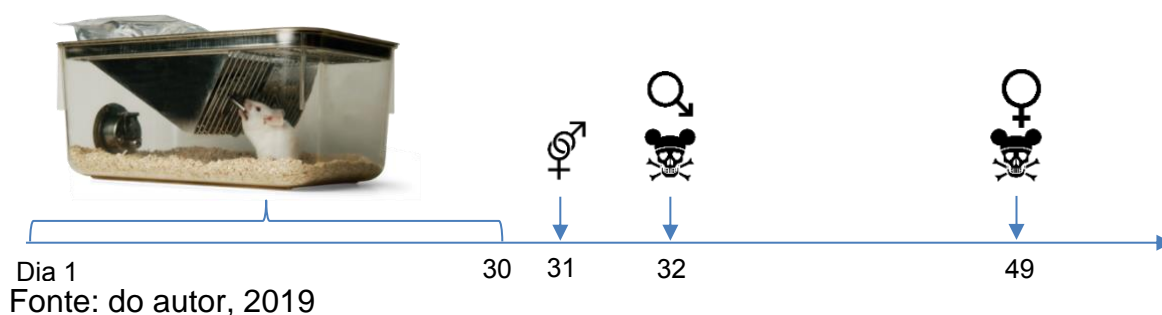
- GC - grupo controle – animais receberam água *ad libitum* sem adição de efluente.
- G01 – grupo 0,1% - animais receberam água *ad libitum* adicionada de 0,1% de efluente
- G05 – grupo 0,5% - animais receberam água *ad libitum* adicionada de 0,5% de efluente
- G5 grupo 5% - animais receberam água *ad libitum* adicionada de 5% de efluente.

3.3 Desenho Experimental

Os camundongos machos foram expostos ou não ao efluente e suas diferentes concentrações pela adição na água de beber, durando esta intervenção 30 dias. No 31º dia, os machos foram pareados com fêmeas não expostas ao efluente,

por 24h. Os machos foram eutanasiados para coleta de amostras biológicas no dia 32. As fêmeas, por sua vez, foram mantidas por 18 dias, sendo então eutanasiadas para verificação dos órgãos reprodutivos. A eutanásia foi realizada com sobredose anestésica com a associação de cetamina e xilazina intra peritoneal. O consumo de água e ração foi aferido diariamente, por meio da subtração diária entre a cota oferecida e o rejeito do dia subsequente. O projeto foi aprovado pelo CEUA-Univates com o número 015/2018. A figura 2 representa o desenho experimental deste estudo.

Figura 2 – Desenho Experimental da Pesquisa



3.4 Avaliação da Biomassa Corpórea

A biomassa corpórea dos animais foi aferida inicialmente e ao final do período experimental. Além disso, após a exposição e eutanásia, as massas relativas dos testículos e dos epidídimos foram calculadas a fim de verificar se o contato direto com o EC provocou hipertrofia ou hipotrofia nesses órgãos. Para isso, foi dividida a massa de cada órgão (g) pela biomassa corpórea do animal (g) aferida no dia da eutanásia (MALAFAIA et al., 2014).

3.5 Avaliação do Efeito do Dominante Letal

Ao final do experimento, foi realizado o teste do dominante letal, a fim de avaliar se a exposição ao EC teria afetado o desempenho reprodutivo dos animais. Para isso, após o último dia de exposição, os animais dos diferentes grupos foram individualizados em caixas padrão para roedores e pareados com uma fêmea nulípara não exposta a poluentes e na fase estral do ciclo ovariano. Os animais permaneceram juntos para se acasalar por um período de 24h e 48h (EHLING et al., 1978). Após esse período, os machos foram eutanasiados para avaliação dos parâmetros seminais e coleta de tecido para estudos posteriores. As fêmeas foram submetidas a

laparotomia após 18 dias de prenhez para avaliação dos seguintes parâmetros: taxa de fertilidade (número de fêmeas prenhas x 100/número de fêmeas), número de implantações embrionárias, taxa de perda pós-implantação (número de implantes - número de fetos vivos x 100/número de implantações), número de reabsorções e frequência de dominante letal (número de reabsorções x 100/número de implantações) (OLIVEIRA et al., 2014).

3.6 Avaliação da Qualidade Seminal

Para avaliação da motilidade dos espermatozoides, após a eutanásia dos camundongos, o ducto deferente esquerdo foi lavado com 300 µL de soro fisiológico, cujo conteúdo foi imediatamente transferido para uma lâmina pré-aquecida a 36°C (LLOBET et al., 1995). Em seguida, foi retirada uma alíquota (de 50 µL) para contagem imediata de 200 espermatozoides em microscópio óptico (em aumento de 400x), e determinação de motilidade progressiva e motilidade total (TARDIF et al., 1998 e SLIMEN et al., 2014). Para a quantificação e avaliação da morfologia dos espermatozoides, o ducto deferente direito foi lavado com 300 µL de solução salina contendo formol a 10%. A contagem dos espermatozoides foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando uma alíquota de 15 µL das amostras fixadas anteriormente. Foram contados os espermatozoides com o auxílio de um microscópio óptico em aumento de 400x.

3.8 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Univates. A eutanásia foi realizada através da administração de intraperitoneal de tiopental sobredosagem de 100mg/kg + lidocaína 10mg/ml. O descarte das carcaças foi realizado de acordo com as normas internas do Laboratório de Habilidades II da Universidade do Vale do Taquari.

3.9 Análise dos dados

Todos os dados foram avaliados para normalidade utilizando o teste D'Agostino-Pearson. Nos casos que ocorreram distribuição não-normal, os dados foram transformados. Os resultados foram analisados através de análise de variância de uma via (One-way ANOVA) ou ANOVA com medidas repetidas seguido de Tukey

para comparar os valores das médias entre grupos experimentais, sendo os cálculos realizados com o software Prism 6 (GraphPad) adotando nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Análise do Efluente

As análises foram realizadas em 09 parâmetros do efluente bruto de curtume. O elevado teor de carbono orgânico total (TOC) e inorgânico (IC) demonstram a presença de grande quantidade de matéria orgânica na amostra. A alta concentração de sódio total e elevada condutividade elétrica, indica a presença de sais no efluente de curtume. Além disso, os dados revelam a presença de altas concentrações de cromo total na amostra. A tabela 3 apresenta os resultados encontrados nos diferentes parâmetros físico-químicos analisados na pesquisa.

Tabela 3 – Resultados da análise físico-química realizada no efluente sem tratamento

Parâmetros	Efluente
pH	4,24
Cor (Pt-co)	23,24
Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	12,72
TOC (ppm)	732,4
IC (ppm)	1615
Cromo total (mg/L)	637,14
Cálcio total (mg/L)	300 ppm
Turbidez (NTU)	560
Sódio total (mg/L)	4540 ppm

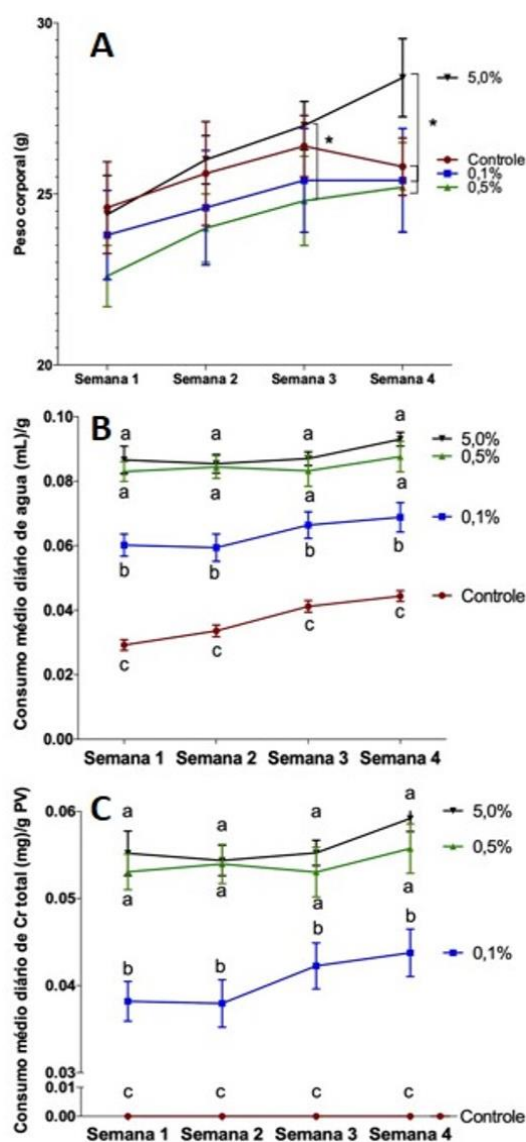
Fonte: do autor, 2019

4.1 Biomassa Corpórea

Com o objetivo de avaliar se a exposição ao EC causou alterações por conta de toxicidade, além da biomassa corpórea dos animais, foram aferidas as massas dos testículos, epidídimos e fígado para verificar a ocorrência de hipertrofia ou hipotrofia nesses órgãos. No que diz respeito à biomassa corpórea, o GC, G01 e G05 não apresentaram alterações, apenas o aumento da massa corpórea provocada pela ação do tempo em virtude de seu desenvolvido comum. Por outro lado, os animais do G5

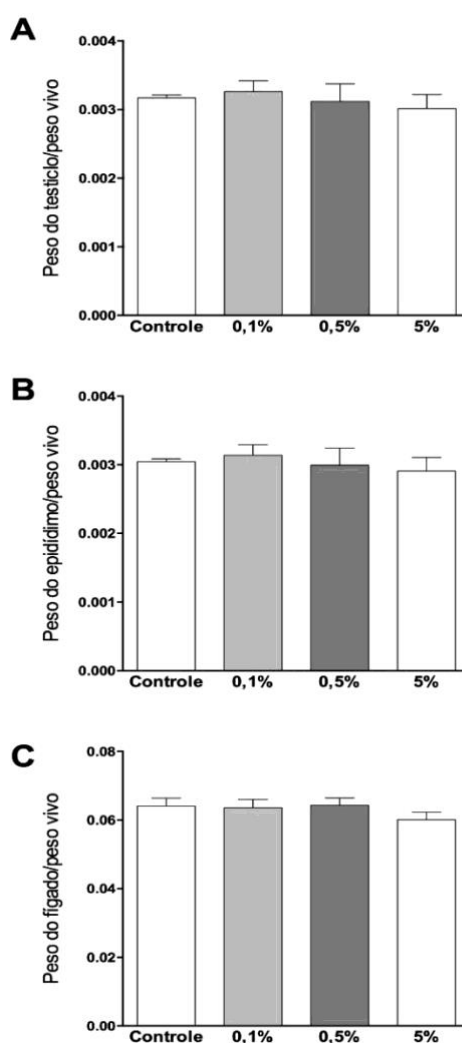
tiveram maior ganho de peso em comparação aos animais dos outros grupos, se intensificando ainda mais na última semana do experimento (Figura 3A). Além disso, durante a fase experimental, o grupo G5 apresentou o maior consumo médio diário de água (Figura 3B), consequentemente, elevando o consumo médio de cromo por kg em cada animal (Figura 3C).

Figura 3 – (A) Evolução do peso corporal dos machos durante as semanas do experimento; (B) Consumo médio diário de água em mL/g de cada animal exposto ao EC durante o experimento. (C) Consumo médio diário de Cromo total em mg/g de cada animal exposto ao EC durante o experimento. As barras representam a média + desvio padrão (n=5/grupo). One-way ANOVA, Tukey ($p<0,05$). As letras minúsculas e asterisco indicam diferenças significativas.



Em relação aos testículos, epidídimos e fígado, não foram observadas alterações de peso relativo entre os diferentes grupos analisados (Figura 4A, 4B, 4C). Dessa forma, esses dados levam a crer que as substâncias presentes no EC, nessas concentrações e por esse período (30 dias), não influenciam de maneira significativa no metabolismo energético dos camundongos.

Figura 4 – (A) Peso relativo dos testículos após dissecação ao final dos 30 dias de exposição ao EC; (B) Peso relativo do epidídimo após dissecação ao final dos 30 dias de exposição ao EC; (C) Peso relativo do fígado após dissecação ao final dos 30 dias de exposição ao EC. As barras representam a Dados apresentados como média + desvio padrão (n=5/grupo). Os dados foram submetidos ao One-way ANOVA, Tukey ($p < 0,05$).

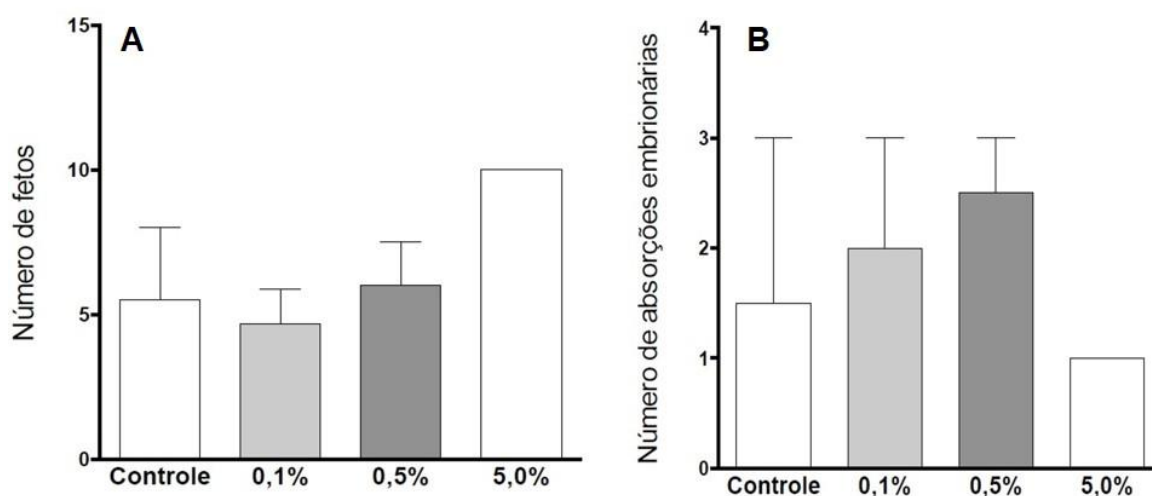


Fonte: do autor, 2019

4.2 Avaliação do Efeito do Dominante Letal

O teste do dominante letal é realizado a fim de verificar o desempenho reprodutivo dos machos. De acordo com os resultados obtidos, as concentrações e o período de exposição ao EC não foram suficientes para provocar alterações no desempenho dos animais. As fêmeas que acasalaram com os animais expostos e não expostos, não apresentaram diferenças significativas no número de fetos entre os grupos (Figura 5A) e tiveram número de absorções embrionárias estáveis (Figura 5B).

Figura 5 - (A) Número de fetos das fêmeas acasaladas com os machos dos diferentes grupos e eutanasiadas 18 dias depois; (B) Número de absorções embrionárias das fêmeas acasaladas com os machos dos diferentes grupos e eutanasiadas 18 dias depois. Dados apresentados como média + desvio padrão (n=5/grupo). One-way ANOVA, Tukey ($p < 0,05$).

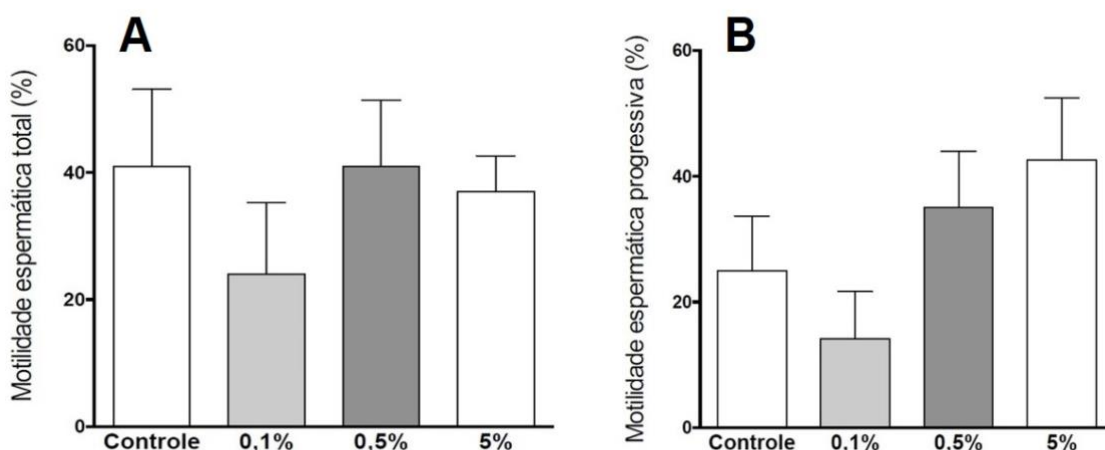


Fonte: do autor, 2019

4.3 Avaliação da Qualidade Seminal

Quanto à motilidade espermática total e progressiva, não foram detectadas alterações significativas nos diferentes grupos (Figura 6A e 6B).

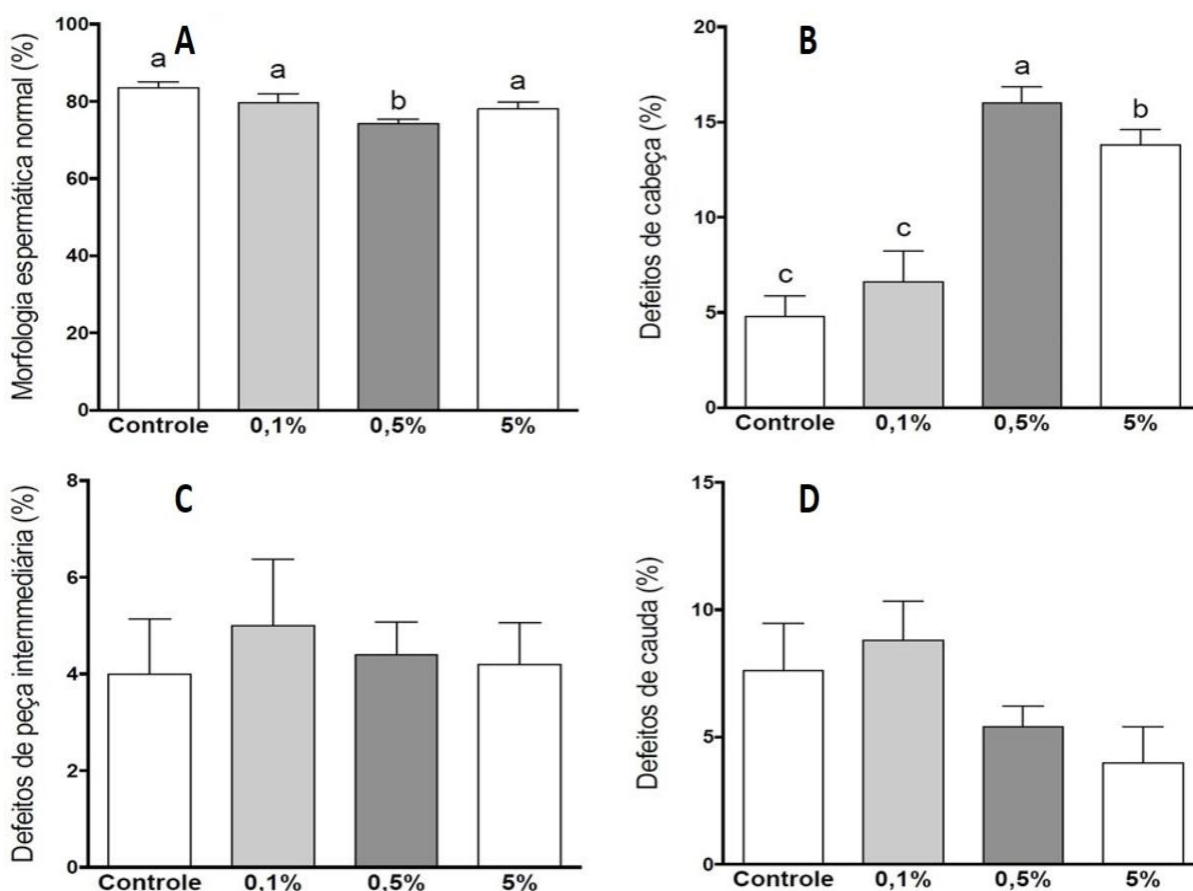
Figura 6 - (A) Motilidade espermática total de camundongos dos diferentes grupos; (B) Motilidade espermática total de camundongos dos diferentes grupos. Dados apresentados como média + desvio padrão (n=5/grupo). One-way ANOVA, Tukey ($p<0,05$).



Fonte: do autor, 2019

Em relação à morfologia dos espermatozóides, foi identificado que no G05 houve uma leve diminuição de espermatozóides morfolologicamente normais (Figura 7A). Além disso, foram identificadas anomalias em algumas amostras nos animais expostos ao efluente. Os camundongos do grupo G05 e G5, apesar do curto período de exposição, insuficiente para a espermatogênese completa de camundongos (35 dias), apresentaram defeitos na cabeça (Figura 7B) e cauda (Figura 7D) dos espermatozóides, comprovando o efeito tóxico de xenobióticos presentes no EC que são capazes de provocar efeitos no sistema reprodutivo dos camundongos durante a espermatogênese. No entanto, não foram detectadas alterações significantes na peça intermediária do espermatozóide (Figura 7C).

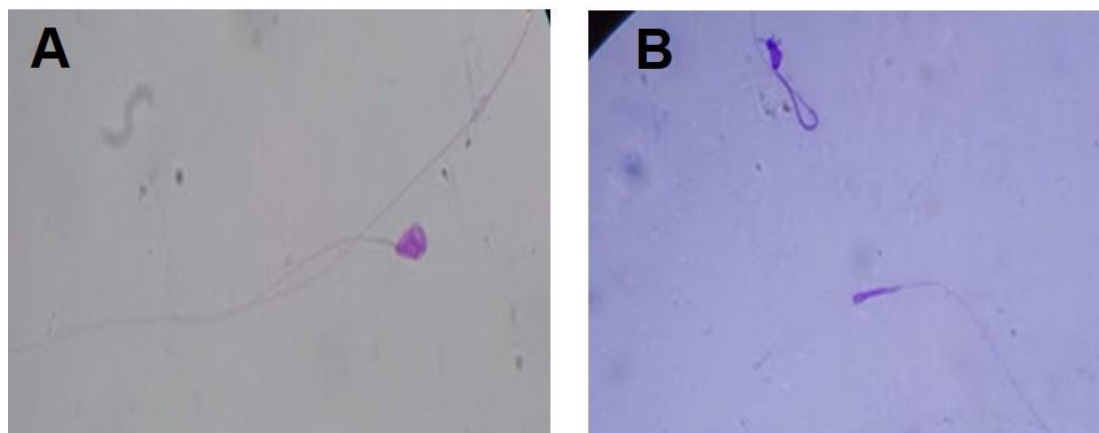
Figura 7 - (A) Morfologia espermática normal dos diferentes grupos de camundongos expostos ao EC; (B) Camundongos que apresentaram defeitos na cabeça do espermatozóide; (C) Camundongos que apresentaram defeitos na peça intermediária do espermatozoide; (D) Camundongos que apresentaram defeitos na cauda do espermatozoide. As barras representam a média + desvio padrão (n=5/grupo). One-way ANOVA, Tukey ($p < 0,05$). As letras minúsculas indicam diferenças significativas.



Fonte: do autor, 2019

A figura 8 representa espermatozoides com alterações morfológicas ocasionada pela exposição dos camundongos ao EC. Apresentaram defeitos de cabeça amorfa (A), cabeça em formato de gancho de botão, em formato e alfinete e cauda enrolada (B).

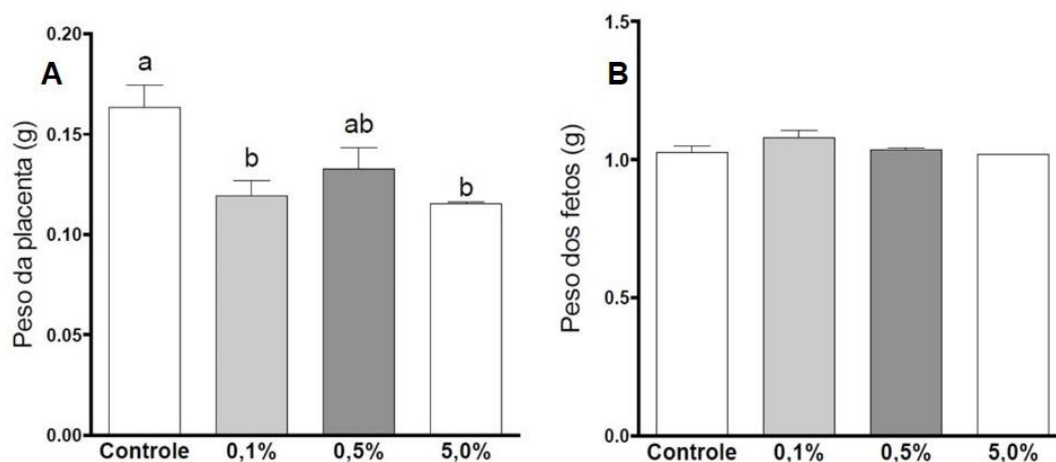
Figura 8 - (A) Espermatozóide com cabeça amorfa; (B) Espermatozóide com cabeça em formato de gancho de botão, em formato de alfinete e cauda enrolada.



Fonte: do autor, 2019

Também houve redução no peso da placenta de fêmeas pareadas com machos expostos (Figura 9A). Isso sugere que substâncias presentes no efluente podem ter afetado o seu desenvolvimento durante a gestação. Entretanto, no que diz respeito ao peso dos fetos, não houveram alterações significativas (Figura 9B).

Figura 9 - (A) Peso da placenta de fêmeas de camundongos pareadas com machos expostos ou não ao EC; (B) Peso dos fetos de fêmeas de camundongos pareadas com machos expostos ou não ao EC. As barras representam a média + desvio padrão (n=5/grupo). One-way ANOVA, Tukey ($p < 0,05$). As letras minúsculas indicam diferenças significativas



Fonte: do autor, 2019

5 DISCUSSÃO

A exposição de mamíferos a EC tem significativa importância devido ao impacto ecológico de grande potencial. Geralmente associado a mortandade de peixes, o descarte de EC bruto no meio ambiente tem impactos ainda desconhecidos, podendo afetar de diferentes formas os ecossistemas atingidos. Os sais de cromo presentes nesse efluente podem oxidar a cromo hexavalente e acarretar efeitos carcinogênicos (COSTA et al., 2009). Os impactos na reprodução de mamíferos podem causar desequilíbrios importantes, afetando inclusive animais não expostos, uma vez que a cadeia alimentar pode ser severamente comprometida. Assim, com este experimento, buscou-se avaliar em modelo de exposição ambiental, os efeitos do EC em concentrações reduzidas, mimetizando a exposição natural. A seguir, serão discutidos os resultados encontrados.

Os resultados dos parâmetros físico-químicos obtidos nas análises do efluente bruto utilizado na exposição experimental dos camundongos ficaram acima do valor máximo permitido (VMP) pela Resolução do CONAMA 430/2011 (trata das condições e padrões de lançamento de efluentes) e pela Resolução CONSEMA 355/2017 (Dispõe sobre os critérios e padrões de emissão de efluentes líquidos para as fontes geradoras que lancem seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul). Destaque para o cromo, metal pesado presente em grande concentração na amostra de efluente bruto (637,14 mg/L). Esse valor é mais de mil vezes o valor permitido pela Resolução COSEMA 355/2017 (0,5 mg/L). O sistema de tratamento de efluentes deve ter alta eficiência para garantir que os níveis de cromo estejam dentro dos valores permitidos. As concentrações de cromo encontradas em efluente bruto de um curtume *wet blue* em Goiânia – GO foram de 859 mg/L (LEMOS, et al., 2015) e em outro curtume do estado de Goiás foi de 493 mg/L (GUIMARÃES, 2018). Esses dados revelam que efluentes bruto de curtume *wet blue* possuem elevados níveis de cromo pela frequente e necessária utilização desse produto no processo de curtimento das peles. O pH ácido, também frequente nesse tipo de efluente, contribui para a oxidação do cromo (III) em cromo (VI), que é favorecida em pH menor que 5 (VALE et al., 2011).

O cromo presente no EC tem capacidade de bioacumulação e biomagnificação entre os níveis tróficos da cadeia alimentar (LIMA, 2010; MARENGONI et al., 2013; TREVIZANI, 2018). Ademais, o cromo faz parte de um

variado grupo de substâncias desreguladoras endócrinas e sua presença em efluentes, mesmo em baixas concentrações, pode causar alterações no organismo de seres vivos (LIMA et al., 2017).

Em experimentos de descromagem oxidativa de resíduo do pó de rebaixadeira em curtumes, a eficiência de remoção do cromo foi de 99,11% (MAHLER, 1999). Os teores de cromo encontrados no EC bruto normalmente são muito elevados, devendo os sistemas de tratamento serem altamente eficientes para a garantia de que o efluente, após tratado, seja descartado dentro dos padrões exigidos. Ressalta-se que o curtume que forneceu o EC bruto realiza todas as etapas necessárias de tratamento, atuando dentro das normas legais vigentes.

Os altos níveis de sódio, alta condutividade e carbono orgânico total (TOC) na amostra, apontam para uma quantidade elevada de matéria orgânica e de sais presentes no efluente, o que justifica um maior consumo de água por parte dos camundongos expostos nos grupos 0,5% e 5%, consequentemente, maior exposição aos contaminantes presentes no efluente de curtume.

É importante salientar que o método de administração do efluente não foi realizado por gavagem oral. Apesar de ser mais preciso em relação às dosagens nos animais em cada grupo, não representa uma exposição natural mais próxima da realidade em que os diferentes animais podem consumir a água de acordo com suas necessidades metabólicas. Ademais, a gavagem é um método mais invasivo e pode representar riscos ao bem-estar dos animais (CONCEA, 2016).

No tocante à massa corpórea e peso relativo dos órgãos do sistema reprodutivo, camundongos *Swiss* expostos ao arsênio (composto também presente na indústria do couro), mostraram um elevado ganho de peso e maior consumo de água em animais expostos por 84 dias em tratamento com 1,0 mg L⁻¹ da substância via água de beber (CARVALHO, 2009). Já em grupos de camundongos *Swiss* expostos a concentrações de 5% e 100% de EC, por 90 dias, não detectaram alterações no peso dos animais dos diferentes grupos, sendo esse parâmetro influenciado apenas pelo fator “tempo”, tendo em vista que os camundongos utilizados no início do experimento estavam em sua fase de puberdade com 32 dias de vida (GUIMARÃES, 2018).

A exposição de fêmeas *Wistar* a efluentes de curtume (5% e 10%) por um período de 15 dias, não causou alterações na biomassa corpórea e no consumo de água desses animais (ALMEIDA et al., 2016). Em pesquisa sobre toxicidade aguda

em fêmeas de camundongos Balb/c expostas a efluente de curtume, doses de 11,25%, 22,5% e 45% de efluente foram aplicadas via intraperitoneal e os resultados demonstraram que não houve alteração física na massa corporal das fêmeas expostas em nenhum dos grupos (LEMOS, et al., 2015). É possível depreender que nos mais diversos experimentos o ganho de massa corporal difere muito pouco entre os diferentes grupos avaliados. Os compostos presentes no EC podem reagir de maneiras diferentes de acordo com as espécies que são expostas.

Em relação às massas dos órgãos como testículos, epidídimos e fígado, as pesquisas com camundongos *Swiss* expostos a concentrações de 5% e 100% também demonstraram que a exposição crônica ao EC não provocou alterações significativas nos animais em seus experimentos (GUIMARÃES, 2018). Fêmeas Balb/c também não apresentaram diferenças estatísticas na massa do fígado, demonstrando que o tratamento intraperitoneal com efluente de curtume não alterou os órgãos (LEMOS et al., 2015). Por outro lado, fêmeas de ratos *Wistar* submetidas ao tratamento com DEHP isolado (500mg/kg/dia), entre o 7º dia de gestação e o 2º dia de lactação, tiveram aumento significativo do peso relativo do fígado (BOTELHO, 2009). Ademais, o autor ainda apresentou dados em que descendentes machos no 2º dia pós-natal também tiveram aumento significativo no peso relativo do fígado. Isso sugere que em diferentes espécies os xenobióticos presentes no efluente de curtume podem ter efeitos diferentes, assim como a concentração e o tipo de contaminante. O DEHP é um ftalato que também pode estar presente em efluentes de curtume, porém em níveis muito inferiores ao cromo.

Poucas são as pesquisas que relacionam a morfologia de espermatozóides de camundongos com a exposição a diferentes concentrações de efluentes de curtume. Em relação à motilidade total e progressiva, não foram identificadas alterações significativas, o que permite inferir que a exposição ao EC pelo período de 30 dias pode não ter sido capaz de influenciar nos parâmetros fisiológicos dos animais.

Os grupos de camundongos expostos a 5% e 100% do efluente por um período de 90 dias, tiveram redução significativa na quantidade de espermatozoides progressivamente móveis e aumento de espermatozoides não progressivos e imóveis (GUIMARÃES, 2018). Além disso, os animais desses grupos apresentaram número significativo de anormalidades nos espermatozoides. Ainda segundo o autor, essas alterações espermáticas podem ter sido provocadas pela degeneração tubular, vacuolização tubular e descamação apical de células germinativas, pressupondo que

as células de Sertoli desses camundongos estariam com suas funções prejudicadas.

Camundongos *Swiss* expostos ao arsênio (também encontrado em efluentes de curtume) tiveram redução plasmática nos níveis de testosterona em 02 grupos estudados expostos à 42 dias e 84 dias (CARVALHO, 2009). O autor concluiu que o arsênio levou a uma desorganização do epitélio germinativo, que certamente comprometeu o processo espermatogênico. É importante citar que o arsênio, apesar de ser encontrado em efluentes de curtume, está presente normalmente em baixas concentrações ($<0,010$ mg/L) (LEMOS et al., 2015).

Em nossa pesquisa, acreditamos que os diferentes compostos presentes no EC, apesar do menor tempo de exposição que em outros estudos (30 dias), causou alterações morfológicas principalmente na cabeça do espermatozóide. Pode-se levar em consideração que se o tempo de exposição fosse maior, as consequências na morfologia dos espermatozoides poderiam ser maiores, tendo em vista que a espermatogênese completa em camundongos é de 35 dias (CANI, 2017).

Descendentes machos de ratos *Wistar*, expostos por via oral a ftalatos DEHP, apresentaram redução nos níveis de testosterona sérica e, conseqüentemente, redução no peso relativo de órgãos que dependem desse hormônio (BOTELHO, 2009). A ação de agentes desreguladores endócrinos têm chamado a atenção de pesquisadores do mundo inteiro, já que o quadro muitas vezes é sub-clínico, mas a cronicidade da exposição pode ter efeitos na fertilidade a médio e longo prazo (MENEZO; DALE; ELDER, 2019, no prelo). Em nossa pesquisa, a redução no peso da placenta de fêmeas acasaladas com camundongos expostos pode ser uma evidência de alteração na capacidade reprodutiva dos camundongos, podendo ocorrer problemas nas futuras proles.

No que diz respeito à capacidade reprodutiva do camundongos, as fêmeas de camundongos *Swiss* pareadas com machos expostos a efluente de curtume, em concentrações de 5% e 100%, não apresentaram diferenciações nos índices de fertilidade (GUIMARÃES, 2018). No entanto, as fêmeas acasaladas com machos expostos nas mesmas concentrações apresentaram menor número de implantações fetais, maior taxa de perdas pós-implantação e maior número de reabsorções, além da maior frequência de dominante letal. É importante frisar que o período de exposição dos machos ao EC foi de 90 dias, 3 vezes mais que o nosso experimento, no qual as fêmeas não apresentaram modificações embrionárias significativas. Tendo em vista que a exposição dos camundongos ao EC foi de 30 dias (tempo insuficiente para uma

espermatogênese completa), pode-se levantar a hipótese de que a exposição a concentrações menores do efluente e em menor período não sejam suficientes para causar alterações na performance reprodutiva dos animais. Entretanto, ainda existem poucos estudos que relacionam a exposição a efluente de curtume com o efeito do dominante letal.

6 CONCLUSÃO

Por fim, esta pesquisa demonstra que mesmo em pequenas concentrações, o EC pode provocar danos no processo de espermatogênese de camundongos *Balb/c*, como foi o caso dos grupos expostos a 0,5% e 5% do efluente que causou alterações significativas na cabeça dos espermatozoides. Esses dados corroboram e reforçam as evidências de que, no médio e longo prazo, os xenobióticos presentes no EC, principalmente o cromo, têm potencial de causar efeitos de desregulação endócrina e, conseqüentemente, alterar de maneira significativa a dinâmica das populações adjacentes de áreas de curtume, causando desequilíbrio ambiental, o que pode tomar proporções alarmantes. Dessa forma, este trabalho abre portas para demais pesquisas sobre os efeitos da exposição crônica a esse tipo de efluente.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, et al. Tratamento de Efluentes Industriais por Processos Oxidativos na Presença de Ozônio. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 818-824, 2004.
- ALMEIDA, S. F.; RABELO, L. M.; SOUZA, J. M.; FERREIRA, R. O.; GUIMARÃES, A. T. B.; PEREIRA, C. C. O.; RODRIGUES, A. S. L.; MALAFAIA, G. Behavioral changes in female Swiss mice exposed to tannery effluents. **Revista Ambiente Água**. Taubaté-SP, v. 11, n. 3, 2016.
- ALVES, V. C.; BARBOSA, A. S. Práticas de gestão ambiental das indústrias coureiras de Franca-SP. **Gestão & Produção**. v. 20, n. 4, p. 883-898, 2013.
- AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Eng. Sanit. Ambient.** v. 18, n. 3, p. 187-204, 2013.
- ARCHETI, E. A. M. E. **Gestão Ambiental e Oportunidades de Minimização de Resíduos Industriais em Curtumes na Cidade de Franca – SP**. Dissertação (Mestrado), Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Pós-Graduação em Engenharia Urbana. São Carlos, SP: UFSCAR, 2001.
- BAIN & COMPANY. **Potencial de diversificação da indústria química Brasileira - Relatório 4**. 34 p, São Paulo, 2014.
- BARDIN, C. W. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: PAYNE, A.H.; HARDY, M.P.; RUSSELL, L.D. (Eds). *The Leydig cell*. Viena: Cache River Press. p.31-42, 1996.
- BASSO, M. L. Gestão da Produção em Curtumes: E o Mundo Mudou... 208. ed. **Revista da Associação Brasileira dos Químicos e Técnicos da Indústria do Couro: ABQTIC**, p. 21 e 22, 2010.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente: Efeitos e Consequências. **Química Nova**. v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.
- BOTELHO, G. G. K. **Efeitos Reprodutivos e Endócrinos no DI (2-etilexil) Ftalato (DEHP) Isolado e Associado a Antioxidantes em Ratos Wistar**. Dissertação (Mestrado), Centro de Ciências Biológicas, Pós-Graduação em Farmacologia. Curitiba, PR: UFPR, 2009.
- BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa nº 33, de 18 de Novembro de 2016. **Diário Oficial da União**. São Paulo, SP, p. 5, nov. 2016.
- CANI, C. G. **Estudo histológico e molecular dos efeitos da exposição ao material particulado inalável fino da cidade de São Paulo nos testículos de camundongos**. Tese (Doutorado), Programa de Endocrinologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2017

CARDOSO, B. N. P. **Efeito da contaminação de cromo em macroinvertebrados aquáticos no córrego Monte Alegre: estrutura da comunidade e teste de toxicidade**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, USP. São Carlos, 2018.

CARSON, R. **Silent Spring**. Boston: Houghton Mifflin, 1962.

CARVALHO, F. A. R. **Morfologia e Morfometria Testicular de Camundongos Adultos Submetidos à Exposição Crônica ao Arsenato**. Dissertação (Mestrado), Centro de Ciências Biológicas, Pós-Graduação em Biologia Celular. Viçosa, MG: UFV, 2009.

CENTRO DAS INDUSTRIAS DE CURTUMES DO BRASIL. **Estudo do Setor de Curtumes**. 2019.

CHENG, C. Y.; MRUK, D. D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. **Rev. Physiol.** v. 82, n. 4, p. 825-874, 2002.

COSTA, K. A. D.; TAVARES, L. C.; BARRA, I. M. M.; SILVA, B. M. P. Impactos Gerados por Efluentes de Curtume no Ambiente Aquático e na Saúde Humana. In: Congresso Brasileiro de Química: A Química e a Sustentabilidade. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2009.

CUNHA, A. M. **Relatório de Acompanhamento Setorial: Indústria do Couro**. AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL – ABDI, 2011.

CUNHA, et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira Farmacogn.** João Pessoa-PB, v. 19, n. 2, 2009.

DESCHAMPS, E.; MATSCHULLAT, J. **Arsênio Antropogênico e Natural – Um estudo em regiões do Quadrilátero Ferrífero**. Editora Fundação Estadual de Meio Ambiente, 1ª edição, Minas Gerais – MG, 2007.

DIAS, S. E. V; CARLONI, A. R; MELO JÚNIO, T. A. Resíduos e Efluentes Gerados pelos Curtumes de Franca: uma Análise Considerando as Novas Exigências Internacionais. **Revista Eletrônica “Diálogos Acadêmicos”**. v. 07, n. 2, p. 49-66, 2014

DUARTE, P. A. F. **Novos poluentes. Principais impactes de compostos desreguladores endócrinos na saúde pública**. 125f. Dissertação (mestrado) – Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.

EHLING, U. H.; MACHEMER, L.; BUSELMAIER, W.; DÝCKA, J.; FROHBURG, H.; KRATOCHVÍLOVA, J.; LANG, R.; MÜLLER, D.; PEH, J.; RÖHRBORN, G.; ROLL, R.; SCHULZE-SCHNCKIN, M.; WIEMANN, H. Standart protocol for the dominant lethal test on male mice set up by the work group “dominant lethal mutations on the ad hoc

Committee Chemogenetics". **Archives of Toxicology**. v. 39, n. 3, p. 173-185, 1978.

FERRARI, W. A. et al. **Guia Técnico Ambiental de Curtumes**. 2º edição. São Paulo: CETESB, 2015.

FREIRE, R. S. et al. Novas Tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**. v. 23, n. 4, p. 504-511, 2000.

GARCIA, N. G. **Descontaminação do Resíduo Industrial do Couro, uma Proposta para o Desenvolvimento Sustentável nos Curtumes**. 88 f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Presidente Prudente, 2015.

GODECKE, M. V.; RODRIGUES, M. A. S.; NAIME, R. H. Resíduos de Curtume: Estudo das Tendências de Pesquisa. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET**. v. 7, n. 7, p. 1357-1378, 2012.

GOULART, M. D. C.; CALLISTO, M. Bioindicadores de Qualidade de Água como Ferramenta de Estudos em Impacto Ambiental. **Revista da FAPAM**. Ano 2, n. 1, 2003.

GUIMARÃES, R. M.; ASMUS, C. I. R. F. Desreguladores endócrinos e efeitos reprodutores em adolescentes. **Cad. Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p. 203-208, 2010.

GUTTERRES, M. **Desenvolvimento Sustentável em Curtumes**. In: XVI ENCONTRO NACIONAL DA ABQTIC. Foz do Iguaçu, 2003.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e Biologia Molecular: Uma introdução à Patologia**. 4º ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora; 2016.

LACERDA, R. L. Uso do Orto-Ftalato de Sódio na redução da concentração de cromo em efluentes de curtume. **Revista Práxis**. Ano II, n. 3, p. 45-49, 2010.

LEMO, D. C. S.; SILVA, B. C.; SOUZA, J. M.; SILVA, W. A. M.; ESTRELA, D. C.; OLIVEIRA, R. S.; GUIMARÃES, A. T. B.; MALAFAIA, G. Toxicidade aguda em camundongos Balb/c expostos a efluentes de curtume. **Multi-Science Journal**. v. 3, n. 1, p. 56-63, 2015.

LIMA, D. R. S.; TONUCCI, M. C.; LIBANIO, M.; AQUINO, S. F. Fármacos e desreguladores endócrinos em águas brasileiras: ocorrência e técnicas de remoção. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 22, n. 6, p. 1043-1054, 2017.

LIMA, M. V. **Avaliação do Potencial de Bioacumulação de Cromo por PISTIA STRATIOTES**. Monografia (graduação) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, USP. São Carlos, 2010.

LLOBET, J. M.; COLOMINA, M. T.; SIRVENT, J. J.; DOMINGO, J. L.; CORBELLÀ, J. Reproductive toxicology of aluminium in male mice. **Toxicological Sciences**. v. 25, n. 1, p. 45-51, 1995.

MAHLER, A. P. D. **Descromagem hidrometalúrgica de resíduos sólidos (serragem de couro)**. 140f. Dissertação (Mestrado) – Pós graduação em Engenharia de Minas, Metalurgia e Materiais, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS. Porto Alegre, 1999.

MANCOPES, F.; GUTTERES, M. **Modificação da Estrutura do Colagênio Durante o Processamento do Couro**. Seminário do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. VIII Octoberforum – PPGEQ. Rio Grande do Sul, 2009.

MARENGONI, N. G.; KLOSOWSKI, E. S.; OLIVEIRA, K. P.; CHAMBO, A. P. S.; GONÇALVES JUNIOR, A. C. Bioacumulação de Metais Pesados e Nutrientes no Mexilhão Dourado do Reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu Binacional. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 359-363, 2013.

MENEZO, Y.; DALE, B.; ELDER, K. The negative impact of the environment on methylation/epigenetic marking in gametes and embryos: A plea for action to protect the fertility of future generations. **Molecular Reproduction and development**. 2019, No prelo.

MOYSÉS, F. et al. Effect of tannery effluente on oxidative status of brain structures and liver of rodents. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 18, p. 15689-15699, 2017.

OLIVEIRA, C. F. A. **Estudo comparado da função testicular de camundongos adultos BALB/c selvagens e portadores de mutação nos genes *Foxn1* e *Prkd***. 82 f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

OLIVEIRA, R. J.; PASSARINI, J. R.; SALES, M. J. S.; KANOO, T. Y. N.; LOURENÇO, A. C. S.; LEITE, V. S.; SILVA, A. F.; MATIAZI, H. J.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Effects of B-glucan polysaccharide revealed by the dominant lethal assay and micronucleus assays, and reproductive performance of male mice exposed to cyclophosphamide. **Genetics and Molecular Biology**. v. 37, n. 1, p. 111-119, 2014.

PASCOAL et al. Aplicação de Radiação UV Artificial e Solar no Tratamento Fotocatalítico de Efluentes de Curtume. **Química Nova**. v. 30, n. 5, p. 1082-1087, 2007.

PIENIZ, L. P. A. Identificação dos Custos Ambientais o Caso do Curtume Mombelli LTDA Tapera-RS. **VIII Congresso Brasileiro de Custos**, São Leopoldo, 2001.

PIRES, A. **Efeito da exposição ao material particulado (PM_{2,5}) da poluição atmosférica na espermatogênese de duas gerações de camundongos**. 106 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PONTIELLI, R. C. N.; NUNES, A. A.; OLIVEIRA, S. V. W. B. Impacto na Saúde Humana de Disruptores Endócrinos Presentes em Corpos Hídricos: Existe Associação com a Obesidade? **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 21, n. 3, p. 753-766, 2016.

PURDOM, C. E.; HARDIMAN, P. A.; BYE, V. V. J.; ENO, N. C.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. **Chemistry and Ecology**. v. 8, n. 4, p. 275-285, 1994.

RUSSEL, L. D.; ETTLIN, I. P.; SINHA, H. A. P.; CLEGG, E. D. **Histopathology of the testis**. Clearwater. Florida: Cache River Press, 1990.

SANTOS, A. M. M.; CORREA, A. R.; ALEXIM, F. M.; PEIXOTO, G. B. T. **Panorama do Setor de Couro no Brasil**. BNDES Setorial. Rio de Janeiro, set. de 2002.

SAUER, T. **Tratamento de Efluentes de Curtume Através do Processo Combinado de Degradação Fotocalítica Seguida por Adsorção em Carvão Ativado**. 249 f. Tese (doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SILVA, B. C. et al. Determinação de doses letais de efluente de curtume em camundongos C57Bl/6J. **Multi-Science Journal**. v. 1, n. 2, p. 45-49, 2015.

SISINNO, C. L. S. Disposição em aterros controlados de resíduos sólidos industriais não-inertes: avaliação dos compostos tóxicos e implicações para o ambiente e para a saúde humana. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, p. 369-374, 2003.

SLIMEN, S.; FAZAA, S.; GHARBI, N. Oxidative stress and cytotoxic potential of anticholinesterase insecticide, malathion in reproductive toxicology of male adolescent mice after acute exposure. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**. v. 17, n. 7, p. 522-530, 2014.

SNEDECOR; COCHRAN apud DELL, R. B.; HOLLERAN, S.; RAMAKRISHNAN, R. Sample Size Determination. *ILAR J.* Author manuscript; available in PMC 2012 Feb 9. Published in final edited form as: **ILAR J.** v. 43, n. 4, p. 207–213, 2002.

TARDIF, A. L.; FARREL, P. B.; TROUERN-TREND, V.; SIMKIN, M. E.; FOOTE, R. H. Use of Hoechst 33342 Stain to Evaluate Live Fresh and Frozen Bull Sperm by Computer-Assisted Analysis. **Journal of Andrology**. v. 19, n. 2, p. 201-206, 1998.

TREVIZANI, T. H. **Bioacumulação e biomagnificação de metais pesados em teias tróficas de estuários do sul-sudeste do Brasil**. 155f. Tese (doutorado) – Programa de Oceanografia, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

VALE, M. S.; ABREU, K. V.; GOUVEIA, S. T.; LEITÃO, R. C.; SANTAELLA, S. T. Efeito da toxicidade de Cr (VI) e Zn (II) no crescimento do fungo filamentoso *Aspergillus niger* isolado de efluente industrial. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 16, n. 3, p. 237-244, 2011.